体外診断用医薬品

製造販売承認番号：22400AMI00005000

＊＊2015 年 8 月改訂（第 7 版）
＊2014 年11 月改訂（第 6 版）

使用の前に本添付文書をよく読むこと

一般的名称：インターフェロン-γ遊離試験キット

T-スポット®.*TB*

【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないこと。
2. 診断にあたっては、他の追加的な検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断すること。
3. 添付文書から逸脱した方法では正しい結果が得られないため、使用前に添付文書をよく読み、操作方法等をよく理解すること。添付文書以外の使用方法については保証しない。
4. 測定にあたり機器を使用する場合は、使用する機器の添付文書および取扱説明書をよく読んでから使用すること。また、使用前に必要に応じて校正を行うこと。
5. 一度使用したストリップは、再使用しないこと。
6. 本品を使用する施設は試験検査の業務管理を順守し、本品の使用に十分な設備を備えること。

＊＊ 7. ヒト血液由来成分を取扱う際は十分に注意し、全ての血液検体は感染性の可能性があるものとして取扱うこと。

【形状・構造等（キットの構成）】

1. 各構成試薬の容量

（24 テスト用）

構成試薬の名称	キットに含まれる容量
マイクロプレート	8 ウェルストリップ×12 本
パネル A 抗原	0.8mL×2 バイアル
パネル B 抗原	0.8mL×2 バイアル
PHA 溶液	0.8mL×2 バイアル
AP 標識抗体試薬	50μL×1バイアル
基質試薬	25mL×1 本

（1200 テスト用）

構成試薬の名称	キットに含まれる容量
マイクロプレート	8 ウェルストリップ×600 本
パネル A 抗原	72mL×1バイアル
パネル B 抗原	72mL×1バイアル
PHA 溶液	72mL×1バイアル
AP 標識抗体試薬	1.5mL×1バイアル
基質試薬	270mL×1 本

2. 反応に関与する成分名

構成試薬の名称	反応に関与する成分の名称
マイクロプレート	抗ヒトインターフェロン-γマウスモノクローナル抗体
パネル A 抗原	ESAT-6 ヒト結核菌に相応する合成抗原
パネル B 抗原	CFP10 ヒト結核菌抗原に相応する合成抗原
AP 標識抗体試薬	アルカリホスファターゼ標識抗ヒトインターフェロン-γマウスモノクローナル抗体
基質試薬	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート（BCIP）
	ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）

【使用目的】

全血から分離させた末梢血単核球（PBMC）において、結核菌特異蛋白刺激によって遊離したインターフェロン(IFN)-γ産生T 細胞数の測定（活動性結核、潜在性結核感染症の診断の補助）。

【測定原理】

結核菌感染に対する免疫応答は、主に T 細胞の活性化を介して行われる。結核菌抗原に感作されたエフェクターT細胞は、結核菌特異抗原と共に反応させた際、抗原による刺激に反応して活性化され、サイトカインの一種である IFN-γを遊離する性質を持つ。本品の基本原理は、結核菌特異抗原の刺激を受けてエフェクターT細胞から遊離されたIFN-γを捕捉することにより、ELISPOT 法を用いて IFN-γ産生 T 細胞数を測定する。[1,2]

検査手順としては、最初に、全血から PBMC 層を分離し、細胞を洗浄した後に、検査に用いる細胞数が一定となるよう調製する。その後、あらかじめ抗 IFN-γ抗体が固相化されたマイクロプレート上のウェルに PBMC 検体を加え、結核菌特異抗原（パネル A、パネル B）と共に反応させる。結核菌に感染している宿主からの検体を用いた場合、エフェクターT 細胞は、抗原刺激を受けることでIFN-γを遊離し、遊離された IFN-γはウェル上の抗体に捕捉される。その後、ウェルから細胞を洗い流し、さらに、アルカリホスファターゼ標識された二次抗体（AP 標識抗体試薬）を加えると、当該抗体はウェル上の抗体に捕捉されている IFN-γの異なるエピトープに結合する。その後、結合しない抗体を洗い流し、可溶性の基質試薬を加える。すると、アルカリホスファターゼの酵素活性により基質が開裂し、刺激されたエフェクターT 細胞の近傍において暗青色の不溶性沈澱による円状の斑点、すなわち「スポット」を生

成する。このスポット一つが、活性化されたT細胞一つに対応している。この数を計測することで、一定のカットオフ値を基準に、結核菌感染の有無を判定することができる。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取法

1. 血液の不適切な採取方法、得られた検体の不適切な取扱いにより、リンパ球機能に影響を及ぼし、偽陰性結果の原因となることがある。
2. 採取した血液は 8 時間以内、別売の T-Cell *Xtend*® 試薬を用いる場合には、採血後 32 時間以内に検査を開始すること。
3. 採取した血液は 18~25°Cで保管または搬送し、冷蔵あるいは凍結保存しないこと。
4. 採血にあたり、EDTA を含む採血管を使用しないこと。

2. 妨害物質、妨害薬剤

1 か月を超える期間の抗結核化学療法を受けた患者への本品の有効性は立証されていない。

3. 交差反応性試験成績

社内評価試験において、サイトカインおよび関連分子等との交差反応性試験を行った。下表の各物質および各濃度において、交差反応を示さないことが確認された。

表:交差反応性試験成績

サイトカイン	濃　度	
	低 濃 度	高 濃 度
IL-2	0.5U/mL	2U/mL
IL-4	7.5ng/mL	100ng/mL
IL-5	7.5ng/mL	100ng/mL
IL-6	7.5ng/mL	100ng/mL
IL-10	7.5ng/mL	100ng/mL
IL-12	7.5ng/mL	100ng/mL
TNF-α	20ng/mL	100ng/mL
IFN-α	100ng/mL	1000ng/mL
IFN-β	100ng/mL	1000ng/mL

※IL:インターロイキン
TNF:腫瘍壊死因子

【用法・用量(操作方法)】

1. 試薬の調製方法

1. マイクロプレート　　そのまま用いる。
2. パネル A 抗原　　そのまま用いる。
3. パネル B 抗原　　そのまま用いる。
4. PHA 溶液　　そのまま用いる。
5. AP 標識抗体試薬　　滅菌 PBS(リン酸緩衝生理食塩水)で 200 倍に希釈して用いる。
6. 基質試薬　　そのまま用いる。

2. 必要な器具・器材・試料等

1. ピペット、滅菌ピペットチップ
2. 15mL 遠心管
3. 採血管
   通常の採血を目的とした、ヘパリン入り採血管。
4. 遠心分離機
   分離方法に応じて、350~1800×g で使用可能なものであり、18~25°C に温度を保つことができるもの。
5. PBMC 計数器具・機器
   血球計算盤を用いて目視で計測するか、あるいは血球計数装置等を用いて自動計測を行うために必要な器具、器材、試薬等。
6. インキュベーター
   37°C±1°C、5%±1%CO_2、加湿条件で使用可能なもの。
7. プレート洗浄器具・機器
   自動プレートウォッシャー、あるいは手動でプレートを洗浄するために必要な器具等。(例:洗浄瓶)
8. 滅菌 PBS(リン酸緩衝生理食塩水)
   Tween を含む PBS を使用しないこと。
   推奨:GIBCO® D-PBS 型番 14040-133
9. 蒸留水または脱イオン水
10. 無菌細胞培養培地
    推奨:
    - GIBCO RPMI1640 培地:型番 11875-093
      (細胞洗浄、および希釈に使用)
    - GIBCO AIM V®無血清培地:型番 31035-025
      (培養時に使用)

    ※培地汚染を防ぐため、必要量の培地をあらかじめ無菌環境下等で分注し、検査終了後に余剰分を廃棄することが望ましい。
    ※培養時は無血清培地の使用が推奨される。
    ※分注された培地は使用前に 37°C に加温する。
11. クラスⅡ生物学的安全キャビネット(推奨)
12. 感染の危険性のある検体を取扱うための手袋、作業衣服、保護眼鏡等。
13. プレート解析装置
    推奨機器例:
    - デジタル顕微鏡
      (例:USB 接続のできる簡易手持ち電子顕微鏡)
    - ELISPOT リーダー (例:米 CTL 社製)
    - 実体顕微鏡
    - 拡大鏡等
14. 予備用 8 ウェルプレートフレーム
    (Oxford Immunotec 社より入手可能)
15. PBMC 分離に用いる器具・器材・試料等
    推奨:
    - Ficoll-Paque PLUS
    - Oxford Immunotec 社製 Leucosep 管
    - BD バキュティナ ™CPT™ 単核球分離用採血管

16. Oxford Immunotec 社製 T-Cell *Xtend* 試薬
（8 時間以上前に採取された血液を使用する場合）

3. 測定（操作）方法

1. 各採血管の添付文書の指示に従い、血液を採取する。推奨される採血量は以下の通り。
   - 成人および 10 歳以上の小児： 6mL ヘパリン管×1 本以上、あるいは 8mL CPT 管×1 本以上、あるいは 4mL CPT 管×2 本以上
   - 2~9 歳の小児： 4mL ヘパリン管×1 本以上、あるいは 4ml CPT 管×1 本以上
   - 2 歳未満の小児： 2mL ヘパリン管×1 本
2. 採取した検体は 18~25°C で保管すること。
3. 採取した血液を以下の各条件で遠心分離する。詳細については、使用する各遠心管の取扱説明書に従うこと。
   - BD バキュティナ CPT 単核球分離用採血管を使用する場合
     8mL の採血管を 1600×g で 28 分間、または、4mL の採血管を 1800×g で 30 分間遠心分離する（冷却遠心機の使用が可能な場合は 18°C で、冷却遠心機以外を用いる場合は 25°C を超えない温度条件下で遠心分離を行うこと）。なお、BD バキュティナ CPT 単核球分離用採血管を使用する場合には、T-Cell *Xtend* 試薬との併用はできない。
   - 上記以外の採血管を使用する場合
     採取した血液を、同量の RPMI1640 培地を用いて希釈し、注意深く Ficoll-Paque PLUS 液の上層に添加する。18~25°C の条件下において、1000×g で 22 分間遠心分離する。
   - Leucosep 管を使用する場合
     15mL 遠心管を用いて血液の希釈を行った後、検体を Leucosep 管に移し、付属の添付文書に従って遠心分離する。
   - T-Cell *Xtend* 試薬を用いる場合
     8 時間以上経過した検体を用いる場合は、血液の希釈前に本試薬を加え、付属の添付文書に従って遠心分離する。
4. 遠心分離した血液から、白濁部分の PBMC 層を採取する。
5. 採取した PBMC 層を 15mL の遠心管等に移す。
6. RPMI1640 培地、もしくは AIM V 培地を加えて 10mL とし、600×g で 7 分間遠心分離する。
7. 上清を捨て、沈殿物を 1mL の RPMI1640 培地、もしくは AIM V 培地で再懸濁する。
8. RPMI1640 培地、もしくは AIM V 培地を加えて 10mL とし、350×g で 7 分間遠心分離する。
9. 上清を捨て、沈殿物を 0.7mL の AIM V 培地中に再懸濁する。
10. 得られた懸濁液中の細胞数を計測する。細胞数の計測は、血球計算盤を用いて目視で行うか、または血球計数装置等を用いることが可能である。取扱いについては、それぞれの器具・器材の添付文書の指示に従うこと。懸濁液を分注する際は、必ずよく混ぜてから操作を行うこと。
11. 最終濃度が 2.5×10^5 個/100μL となるように、500μL の細胞懸濁液を調製する。
12. マイクロプレート上のそれぞれ対応するウェルに以下の試薬を 50μL ずつ添加する。
    - 陰性コントロールウェル： AIM V 培地
    - パネル A ウェル： パネル A 抗原
    - パネル B ウェル： パネル B 抗原
    - 陽性コントロールウェル： PHA 溶液
13. マイクロプレート上の各ウェルに、手順 11 で調製した細胞懸濁液を 100μL ずつ添加する。懸濁液を分注する際は、必ずよく混ぜてから操作を行うこと。
14. マイクロプレートを 37°C、5%CO_2 インキュベーター内で 16～20 時間反応させる。インキュベーター内に設置した後には、可能な限り静置状態を保つこと。
15. 培養後、細胞を捨て、滅菌 PBS200μL でマイクロプレート上の各ウェルを 4 回洗浄する。
16. 滅菌 PBS で AP 標識抗体試薬を 200 倍に希釈する。各検査に使う必要な用量のみ、希釈液を作製すること（マイクロプレート上の各ウェルに 50μL ずつ必要）。
17. マイクロプレート上の各ウェルに、希釈済の AP 標識抗体試薬を 50μL ずつ加える。
18. マイクロプレートを 2~8°C の条件下で 1 時間反応させる。
19. マイクロプレート上の各ウェルに残った液を捨て、滅菌 PBS200μL でマイクロプレート上の各ウェルを 4 回洗浄する。
20. マイクロプレート上の各ウェルに基質試薬を 50μL ずつ添加する。
21. マイクロプレートを 18~25°C で 7 分間反応させる。
22. 蒸留水または脱イオン水でマイクロプレート上の各ウェルを洗浄する。
23. マイクロプレートを 37°C で 4 時間乾燥させる。
24. マイクロプレート上の各ウェル内に発現した、はっきりとした暗青色のスポット数を計測し、下述の判定基準に従い結果を判定する。スポットとは、大きく、正円状であり、色が濃い。密度が薄く、形状がいびつな痕跡は計測しないこと。

【測定結果の判定法】

1. 判定基準

1. 以下の計算式を用いて、①および②を算出する。
   [（パネル A ウェルのスポット数）－（陰性コントロールウェルのスポット数）]…①
   [（パネル B ウェルのスポット数）－（陰性コントロールウェルのスポット数）]…②

＊＊2. 1 で得られた①および②の数値を用いて、以下の判定基準に従い結果を判定する。
   - ①および②の双方、あるいはいずれか一方が 6 スポット以上の場合： 陽性
   - ①および②の双方が 5 スポット以下の場合： 陰性
   - 陰性コントロールウェルが 10 スポット超、あるいは陽性コントロールウェルが 20 未満となる場合： 判定不可

   ※「判定不可」の場合は、再度血液を採取して検査を行うこと。
   ※一部の患者の T 細胞は PHA 溶液に十分な反応性を示さず、陽性コントロールウェルのスポット数が 20 未満となるこ

とがある。そのため、①または②のどちらかが陽性結果を示した場合は、陽性コントロールウェルのスポット数に関わらず「陽性」と判定すること。

2. 判定上の注意

1. 「**1. 判定基準**」1の手順に従い、①および②を算出した際、双方のスポット数の最大値が5~7になった場合、検査結果は「判定保留」と考えられる。数値が8以上となった場合、あるいは、数値が5 未満となった場合と比較して、結果の信頼性がやや低下する可能性がある。このような結果となった場合、再度血液を採取して検査を行うことが推奨される。
2. 再検査の結果が再び「判定保留」となった場合、他の診断方法を用いるか、または、臨床的・医学的症状や患者背景を考慮の上、医師の判断のもとで結核菌感染の状況を総合的に診断すること。
3. 本品で用いられる結核菌特異抗原、ESAT-6 および CFP10 は BCG ワクチンやほとんどの環境中に存在する抗酸菌には含まれないため[3]特異性が高いが、*M.kansasii*、*M.szulgai*、*M.marinum*、*M.gordonae* による感染では陽性結果を示すことがある。[4,5] これらの感染が疑われる場合には、他の診断方法を使用すること。[3]
4. 本品の陽性結果のみによって結核菌感染が確定されるものではないため、他の検査結果も確認し、総合的に判断すること。
5. 本品の陰性結果は、*M.tuberculosis* への感染を否定するものではない。本品により陰性反応が出た場合であっても結核患者との接触が否定できない場合は、6 週間以内に再検査を行うか、臨床症状等と照らし合わせて感染の可能性がないかどうかの検討を行うこと。

【性能】

1. 性能

測定(操作)方法欄の記載に従い、自社管理検体を用いて、感度、正確性および同時再現性試験を行った際、下述の規格に適合する。

1. 感度
   2 種類の管理検体(パネル A 反応性陽性管理検体、およびパネル B 反応性陽性管理検体)を用いて検査を行った際、陽性結果が得られる。
2. 正確性
   3 種類の管理検体(パネルA 反応性陽性管理検体、パネル B 反応性陽性管理検体、および結核陰性管理検体)を用いて検査を行った際、パネル A 反応性陽性管理検体、およびパネル B 反応性陽性管理検体から陽性結果が得られ、結核陰性管理検体から陰性結果が得られる。
3. 同時再現性
   3 種類の管理検体(パネルA 反応性陽性管理検体、パネル B 反応性陽性管理検体、および結核陰性管理検体)を用いて、それぞれの検体につき 3 回検査を行った際、パネルA 反応性陽性管理検体、およびパネル B 反応性陽性管理検体から全て陽性結果が得られ、結核陰性管理検体から全て陰性結果が得られる。
4. 測定範囲
   最小検出感度: ヒト IFN-γ濃度として 1ng/mL

2. 相関性試験成績

日本において、結核菌感染リスクが高い被験者、およびリスクが低い被験者に対して相関性試験を行い、173 名について本品および対照品の検査結果を比較した。

表:本品と対照品の比較

		本　品		合　計
		陽　性	陰　性	
対 照 品	陽　性	75	1	76
	陰　性	0	97	97
合　計		75	98	173

本品と対照品の陽性および陰性結果の一致率は、以下の通りであった。

陽性一致率: 75/76×100=98.7%
(95%信頼区間:92.9~100%)

陰性一致率: 97/97×100=100%
(95%信頼区間:96.3~100%)

全体一致率: 172/173×100=99.4%
(95%信頼区間:96.8~100%)

3. 較正用基準物質

遺伝子組み換えヒトインターフェロン-γ

【その他試験成績】

本品の感度および特異度は、以下のように推計された。

1. 本品および培養検査の結果を比較したところ、培養検査によって陽性と判定され、かつ本品の検査結果が有効と判断された 80 例の検体のうち、本品によって陽性と判定された検体は、78 例であった。以上より、本品の感度は以下のように推計された。
   <u>感度=78/80×100=97.5%(95%信頼区間:91.3~99.7%)</u>
2. スクリーニングにより、結核感染リスクが低いと判断された被験者から採取した111例の検体のうち、本品によって陰性と判定された検体は、110 例であった。以上より、本品の特異度は以下のように推計された。
   <u>特異度=110/111×100=99.1%(95%信頼区間:95.1~100%)</u>

【使用上または取扱い上の注意】

1. 取扱い上(危険防止)の注意

1. ヒト血液由来成分を取扱う際は十分に注意し、全ての血液検体は、感染性の可能性があるものとして取扱うこと。
2. 化学薬品の取扱いに十分に注意すること。
3. 感染防止のため、口によるピペッティングを行わないこと。
4. 検査にあたっては感染防止のため、手袋等を着用すること。

2. 使用上の注意

1. ロットの異なる構成試薬を一緒に使用しないこと。
2. 構成試薬、マイクロプレートのウェル、検体等の汚染を防ぐため、無菌操作を順守すること。
3. マイクロプレートの各ウェルには必ず正しい数の細胞を添加すること。細胞計測に誤りがあった場合、正しい結果が得られないことがある。
4. ピペット等の器具によりマイクロプレートのウェルを傷つけないように注意すること。ウェルに損傷がある場合、正しい結果が得られないことがある。
5. 操作中、マイクロプレートのトレイは移動しないこと。不適切な取扱いにより、プレートの取り違えやウェルの損傷の原因となることがある。
6. マイクロプレートは、本品による操作中およびスポット発現後共に適切な条件で操作し、保管すること。不適切な取扱いにより、正しい結果判定ができなくなることがある。
7. 開封済のキットは、開封から8週間以内(有効期間を超えない)に使用すること。
8. 基質試薬は直射日光を避けて保管すること。
9. 検査は、本品の取扱いを熟知した者が行うこと。
10. PBMC 層の分離操作は、本品の検査で正しい結果を得るために非常に重要であるため、操作の際は必ず本添付文書および使用する各遠心管の取扱説明書等に従うこと。
11. パネル A、パネル B、陽性コントロール試薬の色がオレンジ色がかったピンク色から黄色に変色している場合、試薬のpH が低下し微生物汚染の可能性を示している。この場合、容器は開封せず試薬を使用しないこと。

3. 廃棄上の注意

1. 使用されなかった試薬、血液検体等は各市町村の規制に従って廃棄すること。
2. 検体に接触した器具・試薬および試薬容器等は、感染の危険があるものとし、必要に応じてオートクレーブを用いて 121°C で 20 分間滅菌処理するか、1vol%の次亜塩素酸や、同等の消毒液に浸して一晩処理すること。また、検体飛散時にも同様に対処すること。

【貯蔵方法、有効期間】

1. 貯蔵方法

2~8°C

2. 有効期間

18ヵ月(使用期限は製品ラベルに表示されている)

【包装単位】

24 テスト、1200 テスト

【主要文献】

1. Janeway and Travers (1996) *Immunobiology* 2nd Ed.
2. Staines *et al* (1999) *Introducing Immunology* 2nd Ed
3. Chapman *et al* (2002) AIDS, 16 (17): pp2285-2293.
4. Andersen P, *et al* (2000). Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet,* 356: pp1099–1104.
5. Behr MA, *et al.* (1999) Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science,* 284: pp1520–1523.

【問い合わせ先】

オックスフォード・イムノテック株式会社

＊住所: 神奈川県横浜市港北区新横浜三丁目 8 番 8 号
日総第 16 ビル

＊電話番号: 045-473-8887

【選任製造販売業者】

株式会社理研ジェネシス

住所: 東京都台東区台東一丁目 5 番 1 号 トッパンビル東館

電話番号: 03-3839-8043

【外国特例承認取得者】

Oxford Immunotec Ltd

オックスフォード イムノテック

国名: 英国

【製造業者】

Oxford Immunotec Ltd

オックスフォード イムノテック

国名: 英国

T-スポット.*TB* は、国立血清研究所(デンマーク・コペンハーゲン)、Isis Innovation Limited(英国・オックスフォード)、Public Health Research Institute(米国・ニューヨーク)からの技術供与を受けている。

T-スポット、T-Cell *Xtend* および、Oxford Immunotec 社のロゴは、英国 Oxford Immunotec Limited 社の登録商標である。

© Oxford Immunotec Limited, 2015. All rights reserved.